

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861779

研究課題名(和文) 舌の発生分子機構解明の基盤研究～一次繊毛からの解析～

研究課題名(英文) The primary study of the role of the primary cilia in tongue development

## 研究代表者

川崎 勝盛 (kawasaki, katsushige)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40529640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一次繊毛の舌の発生での役割を検索した。一次繊毛タンパクであるOdf1の神経堤由来細胞特異的欠損マウスで舌の異常を認めた。Odf1神経堤由来細胞特異的欠損マウスの舌における一次繊毛の長さが、著しく短くなっていることが確認された。それに対し、Odf1の上皮特異的欠損マウス、Odf1の中胚葉由来細胞特異的欠損マウス、Odf1の内胚葉由来細胞特異的欠損マウスで、著しい舌の異常は観察されず、神経堤由来細胞の一次繊毛が、舌の発生に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of the primary cilia in tongue development. Mice with neural crest-derived cell conditional mutation of the primary cilia protein, Odf1, showed notable tongue abnormalities, and the primary cilia were significantly shortened. However, mice with epithelium-, mesoderm- and endoderm-derived cell conditional mutation of Odf1 exhibited no significant tongue abnormalities, suggesting that the primary cilia in neural crest-derived cells play a critical role in tongue development.

研究分野：発生学

キーワード：舌 一次繊毛

## 1. 研究開始当初の背景

舌は摂食嚥下、構音、味覚など多種で重要な機能を持つ器官で、ヒトの QOL にとって欠かすことのできない器官である。その一方、口腔内では最も癌発病率が高い組織であるにも関わらず、切除後の再建手術などでは、それらの重要な機能のほとんどが回復しないのが現状である。そのため、新しい再建法や再生療法の確立が望まれている。再生は発生過程の再現であり、舌の再生療法の確立には、舌の発生学的知見が欠かせない。しかしながら、舌の分子レベルでの発生メカニズムは、未だほとんど明らかにされていない。

舌の多種にわたる機能を満たすため、その構造は、非常に複雑な走行を示す。筋肉、鋭敏な感覚を伝える受容器および神経、初期消化を担う唾液分泌装置と多種にわたる。そのため、その発生に、中胚葉由来、神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、さらに第 1 鰓弓(咽頭弓)由来細胞、第 2 鰓弓(咽頭弓)由来細胞、第 3 鰓弓(咽頭弓)由来細胞など、他の器官では類を見ない多種多様な細胞が関与する。このことが、舌の発生メカニズム研究を難しくしている理由の一つと考えられている。申請者は、過去に糸状乳頭形成における Bmp シグナルの機能を明らかにしたが、(Kawasaki et al. Arch Oral Biol 157; 805-813, 2012) 舌の発生メカニズムの核心には迫っていない。

発生メカニズムを解明する鍵として、標的臓器に異常の生じる先天性疾患からのアプローチがあげられる。舌の運動障害、過誤腫、溝状舌等、さまざまな舌の異常を示す先天性疾患に、繊毛病がある。この繊毛病は、一次繊毛(primary cilia)の機能障害によって生じる 30 以上の症候群の総称である。一次繊毛は、脊椎動物のほぼ全ての細胞に認められるものの、長い間、存在意義の不明な細胞小器官であった。しかし、近年の分子生物学の急速な発展により、細胞運動、外液移動、化学受容(嗅覚)、光受容(視覚)、機械受容(聴覚)、シグナル伝達、細胞極性の決定といった驚くべき多岐にわたる機能が、徐々に明らかとなってきている。この繊毛病では、舌以外に、顔面、四肢、脳、腎臓、肝臓など種々の臓器で、先天的または後天的な機能不全を示し、一次繊毛が器官の形成や恒常性に必要不可欠である事を示している。しかし、分子レベルでの一次繊毛研究は生物学全体としても未だ黎明期であり、一次繊毛の舌の発生での機能もまったく明らかにされていない。

一次繊毛は、軸系、基底小体、IFT 複合体、モーターにより構築され、400 種類以上のタンパクが一次繊毛タンパクとして存在すると推察されている。それらのタンパク質が軸系、基底小体、IFT 複合体の各構造体に局在し、それぞれが協調的に繊毛機能に関わっていると考えられている。事実、一次繊毛局在と同定されたタンパクの欠損マウスの

腎臓や脳では、様々な繊毛病患者と同じ症状が認められ、これらの一次繊毛タンパク質の詳細な分析が、一次繊毛の機能解明に重要であることを示している。

申請者は繊毛膜タンパクの欠損マウスにおいて、顎顔面に先天的異常が引き起こる事を過去に報告した(Hum Mol Genet 22; 1873-1885, 2013)。申請者は、さらに本研究の予備実験において、一次繊毛タンパクである Ofd1 の欠損マウスの舌に様々な異常を認め、一次繊毛タンパク欠損マウスが舌発生研究の実験モデルとして有用であることを示した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、より包括的でより詳細な一次繊毛の理解を得るために、一次繊毛を構築する各構造体に特異的な分子をそれぞれ選択し(Ofd1: 基底小体局在タンパク、Pkd2: 繊毛膜局在タンパク、Ift88: IFT 複合体局在タンパク)、それぞれの遺伝子を、欠損させたマウスを作成し、そのマウスの解析から、舌の発生における一次繊毛の機能を明らかにすることとした。また、舌は、神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、中胚葉由来細胞により発生する。それぞれの細胞が協調的に相互作用を図りながら、発生が進行していくと考えられている。一次繊毛はすべての細胞に存在しているため、全細胞からの一次繊毛タンパクの欠損は非常に複雑な解析となる。そこで本研究では、より単純化させるため、各細胞(神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、中胚葉由来細胞)からのみ特異的に一次繊毛タンパクを欠損させたマウスを作成し、その解析から各細胞での役割を明らかにする。それら各細胞での一次繊毛の機能を統合させ、一次繊毛全体の舌発生での機能解明へと昇華させていくことを目的とした。

一次繊毛は、初期胚における左右軸の決定に必須であるため、一次繊毛タンパクの全細胞からの欠損は、左右軸の決定が欠落し、舌形成以前の初期胚でマウスが死亡する確立が非常に高くなり、conventional な欠損マウスでの舌の機能解析は難しい。組織特異的欠損マウスの作成は、この初期胚の致死を回避できる利点も持つ。

## 3. 研究の方法

(1) 各細胞(神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、中胚葉由来細胞)特異的欠損マウスの作成とその形態的解析

部位特異的マウスの作成ならびに各マウスの舌の形態変化を検索した。

(2) 一次繊毛の形態変化の検索

一次繊毛タンパク欠損マウスにおける一

## 次繊毛の形態変化を検索した

(3) 各一次繊毛タンパク欠損マウスの舌における分子変動の分析

舌に異常の認められた欠損マウスにおける分子レベルでの変化を解析するため、in situ hybridization、qPCR、免疫染色法を行った。

(4) 一次繊毛分子間相互作用の解析

欠損によって舌に異常の認められた一次繊毛分子を複数欠損させたマウスを作成し、形態学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 各細胞(神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、中胚葉由来細胞)特異的欠損マウスの作成とその形態的解析

Odf1 を神経堤由来細胞からのみ欠損させたマウスを作成するために Odf1 floxed マウスを、Wnt1Cre マウスと交配させた。同様に Odf1 を中胚葉由来細胞から欠損させたマウスを作成するために Mesp1Cre マウスを、Odf1 を外胚葉由来細胞から欠損させたマウスを作成するために K14Cre マウスを、Odf1 を内胚葉由来細胞から欠損させたマウスを作成するために Sox17Cre を、それぞれ Odf1 floxed マウスと交配させた。それら4種のマウスのうち、舌に異常を認めたのは、Odf1 を神経堤由来細胞からのみ欠損させた Odf1;Wnt1Cre マウスのみであった。このことは、神経堤由来細胞の Odf1 が、舌発生に重要であることを示している。

Odf1;Wnt1Cre マウスのうち、Odf1 遺伝子の存在しない Odf1;Wnt1Cre(Hemizygous) マウスでは、舌の形成が認められなかった。Odf1 遺伝子を持った allele と、Odf1 遺伝子

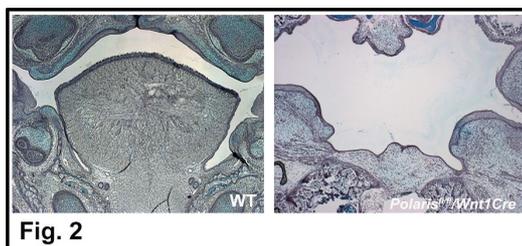


を持たない allele を両方持つ Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスでは、舌に異所性の脂肪と骨を認めた。(Fig. 1)

同様の方法で、繊毛膜局在タンパクである Pkd2 の神経堤由来細胞特異的欠損マウス;Pkd2;Wnt1Cre を作成したが、Homozygous、Heterozygous マウス共に、舌に著しい異常は認められなかった。

同様の方法で、IFT 複合体局在タンパクである Ift88 (Polaris) の神経堤由来細胞特異的欠損マウス;Ift88;Wnt1Cre ならびに外胚葉由来細胞特異的欠損マウスを作成した。Heterozygous マウスに舌に著しい異常は認められなかったものの、Ift88 遺伝子の存在しない Homozygous マウスで、Odf1;Wnt1Cre(Hemizygous) マウスで認めら

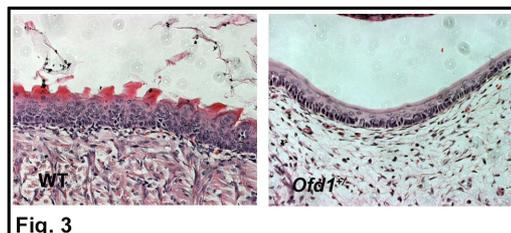
れた舌の欠損に類似した表現形が観察された。(Fig. 2)



以上のことから、Ift88 の神経堤由来細胞での舌発生における機能が、Odf1 と極めて類似していることが示された一方で、Heterozygous マウスで、表現形が違うことは、発症メカニズムに若干の違いが存在することが示唆された。

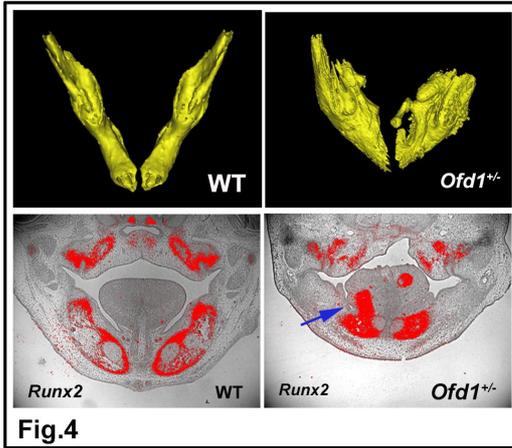
舌に脂肪と骨を認める Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスの表現形を検索するために、舌形成開始時期から検索を行った。舌の形成は胎生 (E) 12.5 日付近から開始する。Wild-type マウスでは、この時期の舌の間葉は、ほぼ神経堤由来細胞で満たされた均一な組織像を示した。しかし、E12.5 日の Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスでは、舌の形成は認められるが、間葉は均一な組織像ではなく、細胞密度の高い部位と低い部位が混在していた。その細胞密度の低い部位は、そのまま脂肪組織へと移行していく傾向が観察された。舌には、E14.5 付近から、中胚葉由来の細胞が侵入し、舌筋へと分化を始める。Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスでは、その時期から舌の形が異常な分葉状を呈するようになることが明らかとなった。

舌の上皮には様々な舌乳頭が存在し、E15.5 から組織学的にも確認できるようになる。しかし、Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスで認められる脂肪組織に面する上皮に乳頭は観察されなかった。これは、乳頭形成も上皮-間葉相互作用で制御されていること、舌乳頭形成には間葉からのシグナルが重要であること、その間葉での乳頭誘導機能に Odf1 が必須であること、異所性の脂肪組織に乳頭組織形成能力がないことを示している。



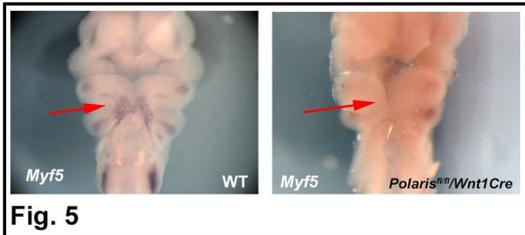
(Fig. 3)

Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスの舌に認められる骨の検索のために、マイクロCT による観察ならびに骨芽細胞のマーカー遺伝子の解析を行った。その結果、Odf1;Wnt1Cre(Heterozygous) マウスの舌の骨が下顎骨に連続し、舌内に認められる骨芽細胞マーカー遺伝子陽性ドメインも、下顎骨



**Fig.4**  
 内の骨芽細胞のマーカー遺伝子陽性ドメインと連続していた。(Fig. 4)つまり、下顎骨の骨芽細胞が舌内に侵入し、舌内に骨を形成していることが示唆された。

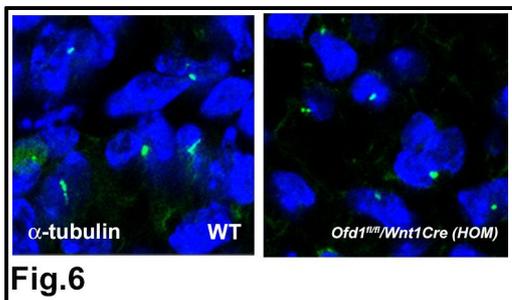
舌の認められなかった *Ift88;Wnt1Cre* マウスの E10.5 日で、筋肉の前駆細胞を



**Fig. 5**  
*Myf5* の発現で確認した結果、*Ift88;Wnt1Cre* マウスにおける *Myf5* の発現の著しい低下が認められた。(Fig. 5)

(2) 一次繊毛の形態変化の検索

舌に異常の認められた *Ofd1;Wnt1Cre*(Heterozygous) マウスにおける一次繊毛の形態変化を検索するために、一次繊毛に局在する acetylated- $\alpha$ -tubulin および  $\alpha$ -tubulin の免疫染色を行った。その結果、*Ofd1;Wnt1Cre*(Heterozygous) マウスの舌で、一次繊毛が著しく短くなっていることを見出した。(Fig. 6)



(3) 各一次繊毛タンパク欠損マウスの舌における分子変動の分析

*Fgf* シグナルのマーカーである p-ERK の *Ofd1;Wnt1Cre*(Heterozygous) マウスの舌における発現に、著しい異常は認められなかった。*Bmp* シグナルのマーカーである p-Smad1/5/8 の免疫染色を行ったが、*Ofd1;Wnt1Cre*(Heterozygous) マウスの舌に

おける著しい異常は観察されなかった。細胞密度の低い脂肪予定領域に *Shh* シグナルのマーカーである *Ptch1* や *Gli1* の発現が認められた。また、p-JNK の陽性細胞も細胞密度の低い脂肪予定領域に観察された。*Shh* シグナルの舌における機能を検索するために、*Shh* シグナルに不可欠な *Smo* を、*Ofd1;Wnt1Cre* マウスと同様に *Wnt1Cre* を用いて、神経堤由来細胞から欠如させたマウスを作成した (*Smo;Wnt1Cre*)。 *Smo;Wnt1Cre* マウスは、舌の形成が著しく減少していたが、*Ofd1;Wnt1Cre*(Hemizygous) マウスにおける舌の異常とは異なる表現形であった。*Shh* が上皮で過剰発現するマウスを作成し、その舌を検索したが、*Ofd1;Wnt1Cre*(Hemizygous) マウスに認められるような異常は観察されなかった。また、*Smo;Wnt1Cre* マウスの舌に、脂肪様組織は認められなかった。Primary cilia は、*Shh* シグナルの活性化する部位であることは知られているが、これらの結果は、*Ofd1;Wnt1Cre*(Hemizygous) マウスの舌の表現形は、*Shh* シグナルの異常のみで引き起こっていないことを示唆した。

(4) 一次繊毛分子間相互作用の解析

神経堤由来細胞特異的欠損マウスで、舌に異常のあった *Ift88* と *Ofd1* の両方を神経堤由来細胞特異的に欠損させたマウス (*Ofd1;Ift88;Wnt1Cre* マウス)を作成し、舌の変化を、*Ift88* と *Ofd1* 単独欠損マウス (*Ofd1;Wnt1Cre*, *Ift88;Wnt1Cre*)と比較した。しかし、*Ofd1;Wnt1Cre*, *Ift88;Wnt1Cre* と *Ofd1;Ift88;Wnt1Cre* マウスの間に著しい変化は認められなかった。これらのことから、*Ift88* と *Ofd1* 間に、直接的な関連性がない可能性が高いことを示唆した。

以上の結果から、舌の間葉細胞の *Ofd1* が舌形成に必須の分子であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
 出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川崎 勝盛 (KAWASAKI Katsushige)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：40529640

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：